

**ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК, ПОДВЕРГАВШИХСЯ  
ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ, НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА  
ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ**

Королевская Л. Б. <sup>1</sup>,  
Шмагель К. В. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»).

**PRECULTIVATION OF CELLS SUBJECTED TO LONG-TERM  
CRYOPRESERVATION NEGATIVELY AFFECTS THE PROLIFERATIVE  
ACTIVITY OF T-LYMPHOCYTES**

Korolevskaya L. B. <sup>a</sup>,  
Shmagel K. V. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences (“IEGM UB RAS”).

## Резюме

Мононуклеарные клетки периферической крови являются ценным биологическим материалом для большинства иммунологических исследований. Криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови обеспечивает доступ к большим объемам биоматериала в любой момент времени. Исходя из того, что криоконсервация может влиять на различные параметры клеток, рядом авторов было предложено введение этапа прекультивирования размороженных клеток для восстановления их функций.

**Цель исследования.** Оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов.

**Материалы и методы.** В работе была использована венозная кровь, полученная от 18 относительно здоровых добровольцев, подписавших информированное согласие. Мононуклеарные лейкоциты выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла общепринятым методом. Полученные клетки подвергали контролируемому замораживанию до  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение суток, затем переносили в жидкий азот. Длительность хранения образцов составила  $40 \pm 1,4$  мес. После размораживания клетки делили на две части, одну из которых сразу окрашивали 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE), стимулировали фитогемагглютином и культивировали в полной питательной среде, содержащей интерлейкин-2, в течение 7 суток. Вторую часть клеток прекультивировали в полной питательной среде (18 час), затем обрабатывали, как указано выше. Оценку пролиферации Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Установлено, что этап прекультивирования не влияет на относительное количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Вместе с тем в пробах с прекультивированными клетками было снижено число дочерних генераций, формируемых как  $\text{CD4}^+$ , так и  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами. Кроме того, выявлено значительное увеличение доли умирающих элементов среди вступивших в деление  $\text{CD4}^+$  Т-клеток. При этом в пуле  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов данного последствия этапа прекультивирования не было отмечено.

**Выводы.** Таким образом, прекультивирование клеток существенно увеличивает процент Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Данный феномен был обнаружен только среди  $\text{CD4}^+$  Т-клеток, что, по-видимому, отражает их большую чувствительность к гибели *in vitro* по сравнению с  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, криоконсервация, пролиферация, прекультивирование (отдых), проточная цитометрия.

### **Abstract**

Peripheral blood mononuclear cells are a valuable biological material for most immunological studies. Cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells provides access to large amounts of biomaterial at any time. Since cryopreservation can affect various cell parameters, several authors have proposed introducing a precultivation step for thawed cells to restore their functions.

**The aim of the study.** To evaluate the effect of preculturing long-term cryopreserved cells on T lymphocyte proliferative capacity.

**Methods.** Venous blood obtained from 18 relatively healthy volunteers who signed informed consent was used. Mononuclear leukocytes were isolated by centrifugation in a diacoll density gradient using a standard method. The resulting cells were subjected to controlled freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 24 hours before being transferred to liquid nitrogen. The duration of sample storage was  $40 \pm 1.4$  months. After thawing, the cells were divided into two parts; one part was immediately stained with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE), stimulated with phytohemagglutinin, and cultured in complete culture medium containing interleukin-2 for 7 days. The second part of the cells was precultivated in complete culture medium (18 hours) and then treated as described above. T lymphocyte proliferation was assessed by flow cytometry.

**Results.** It was found that the preculture stage did not affect the relative counts of proliferating T lymphocytes. However, the number of daughter generations formed by both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was reduced in samples with precultured cells. Additionally, a significant increase in the proportion of dying elements among dividing CD4<sup>+</sup> T cells was observed. This consequence of the preculture stage was not found in the pool of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

**Conclusion.** Thus, preculturing significantly increases the percentage of T lymphocytes dying during division. This phenomenon was only detected among CD4<sup>+</sup> T cells, which appears to reflect their greater sensitivity to *in vitro* death compared to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

**Keywords:** T-lymphocytes, cryopreservation, proliferation, precultivation (rest), flow cytometry.

## 1 Введение

Пролиферация Т-лимфоцитов необходима для формирования эффективного адаптивного иммунного ответа. Использование проточной цитометрии для оценки пролиферативной активности Т-клеток служит рутинным методом в клеточной биологии, иммунологии, клинической медицине. Однако доступность образцов в больших количествах в определенное время и в определенном месте остается сложной задачей, поэтому сбор и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) для последующего анализа являются обычной практикой. Вместе с тем негативными последствиями криоконсервации могут быть, например, снижение экспрессии поверхностных и/или внутриклеточных маркеров, а также изменение функциональной активности клеток [4, 9]. Для сглаживания эффектов криоконсервации рядом авторов был введен этап прекультивирования: отдых приготовленных после разморозки МКПК в культуральной среде в течение 14-18 часов при +37°C [4, 8]. Считается, что процесс покоя удалит клетки, обреченные на гибель, и позволит «отдохнувшим» клеткам восстановить функциональные способности [6, 8]. Представленные в доступной литературе данные, как правило, отражают сравнение показателей функциональной активности свежеизолированных и криоконсервированных МКПК, либо оценивают последствие сроков криоконсервации (1-12 мес.) на состояние и функции различных клеток [3, 4, 5, 9]. При этом авторы не всегда вносят в протокол исследования этап «отдыха» клеток.

Целью настоящей работы была оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной (более трех лет) криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов.

## 2 Материалы и методы

Объектом исследования служили МКПК 18 относительно здоровых доноров, среди которых преобладали мужчины (61 %). Средний возраст обследованных субъектов составил  $37,4 \pm 1,2$  лет. Исследование было одобрено этическим комитетом «ИЭГМ УрО РАН» (IRB 00010009), каждый участник подписал информированное согласие. Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной крови раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS, Gibco, США) в градиенте плотности Диаколл (1,077, Диаэм, Россия). Выделенные клетки после двукратного отмывания в растворе DPBS помещали в термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС, Biowest, Колумбия), содержащую 10 % диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Криопробирки с клетками подвергали контролируемому замораживанию в коммерческих штативах CoolCell (Corning, США) в морозильной камере (-80°C) в течение суток, после чего переносили в криохранилище с жидким азотом (-196°C) до

44 последующего использования. Средняя продолжительность хранения  
45 образцов составила  $40 \pm 1,4$  мес.

46 Перед проведением исследования криопробирки с МКПК  
47 размораживали (водяная баня,  $+37^\circ\text{C}$ ). К клеткам, перенесенным в 15-мл  
48 пробирки, капельно вносили десятикратный объем полной питательной среды  
49 (ППС): RPMI-1640, содержащая 25 мМ Хепеса и 2 мМ L-глутамин (Gibco,  
50 США), 10 % ЭТС, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-  
51 Aldrich, США). После центрифугирования (400 g, 10 мин) клеточный осадок  
52 ресуспендировали в ППС. Подсчет жизнеспособных клеток проводили в  
53 камере Горяева с окраской трипановым синим. Доля жизнеспособных клеток  
54 составила не менее 92 %.

55 Полученные клетки делили на две части, одну из которых сразу после  
56 разморозки (проба «свежеразмороженные») окрашивали 5 мкМ 5(6)-  
57 карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE,  
58 BioLegend, США) и инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  в течение 8 мин. Затем для  
59 прекращения реакции клетки дважды отмывали средой RPMI-1640,  
60 содержащей 20 % ЭТС. После подсчета в камере Горяева клетки  
61 ресуспендировали в концентрации  $1 \cdot 10^6$ /мл в ППС, содержащей 100 нг/мл  
62 интерлейкина-2 (IL-2, Gibco, США). Пролиферацию клеток индуцировали  
63 внесением фитогемагглютинаина-П (ФГА, Serva, Германия) в конечной  
64 концентрации 15 мкг/мл. Пробы культивировали в течение 7 суток ( $+37^\circ\text{C}$ , 5  
65 %  $\text{CO}_2$ ). Контролем служили нестимулированные клетки, окрашенные CFSE,  
66 и стимулированные пробы без красителя. На 3-4 сутки культуральную среду в  
67 каждой пробе меняли на среду соответствующего состава. Вторую часть  
68 размороженных клеток помещали в пробирки с ППС и инкубировали в  
69 течение 18 часов ( $+37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), чтобы дать время на восстановление (проба  
70 «прекультивированные»). После этого клетки окрашивали CFSE и  
71 культивировали с ФГА или без него, согласно вышеописанному протоколу.

72 По окончании времени инкубации клетки собирали, окрашивали  
73 витальным красителем Zombie UV, моноклональными анти-CD3-BV605, анти-  
74 CD4-PE, анти-CD8-BV-510 антителами (BioLegend, США) и анализировали с  
75 использованием проточного цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter,  
76 США). Среди стимулированных  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов определяли долю  
77 пролиферирующих клеток ( $\text{CFSE}^{\text{low}}$ ), подсчитывали число дочерних  
78 генераций и процент клеток, гибнущих в процессе деления  
79 ( $\text{ZombieUV}^+\text{CFSE}^{\text{low}}$ ).

80 Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью  
81 программного обеспечения «GraphPad Prism 8» (GraphPad Software, США).  
82 Количественные данные представлены в виде медиан и интерквартильных  
83 размахов (25–75 перцентиль). Множественные сравнения между группами  
84 проводили с помощью критерия Тьюки. Критический уровень значимости при  
85 проверке статистических гипотез приняли равным 0,05.

### 86 3 Результаты и обсуждение

87 Оценка пролиферативной активности Т-лимфоцитов, размороженных  
88 после длительной (более трех лет) криоконсервации и стимулированных *in*  
89 *vitro* в течение 7 суток, показала следующее. Доля CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup> Т-клеток в  
90 пробах «свеже размороженные» составила 79,5±2,3 %, в образцах с  
91 прекультивированными клетками – 79,7±1,6 %. Аналогичные показатели были  
92 установлены при оценке относительного количества поделившихся CD8<sup>+</sup> Т-  
93 лимфоцитов. Процент CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup> в пробах «свеже размороженные» и  
94 «прекультивированные» составил 78,6±4,6 % и 77,9±3,6 % соответственно.  
95 Ранее рядом исследователей при оценке пролиферативной способности  
96 клеток, культивированных сразу после разморозки, было установлено, что  
97 доля CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup> и CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup> не превышала 30 % [9]. Необходимо  
98 отметить, что в указанной работе использованная авторами культуральная  
99 среда не содержала ИЛ-2. Поскольку ИЛ-2 является важным фактором  
100 выживания Т-лимфоцитов [1], возможно, что его отсутствие в культуральной  
101 среде могло приводить к снижению митотической активности клеток. Кроме  
102 того, на функциональность клеток могут влиять такие факторы, как состав  
103 среды для заморозки и длительность криоконсервации, этап  
104 прекультивирования клеток, индукторы и продолжительность стимуляции, а  
105 также ряд других [2, 5, 8]. Полученные нами в настоящей работе данные  
106 свидетельствуют о том, что почти 80 % Т-лимфоцитов, размороженных после  
107 длительной (более трех лет) криоконсервации, отвечают на стимуляцию  
108 митогеном, индуцирующим переход клетки из состояния покоя к делению.  
109 При этом внесение в протокол исследования предварительного этапа «отдых»  
110 не влияет на относительное число пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-  
111 лимфоцитов.

112 Вместе с тем, проведенная нами оценка количества дочерних генераций,  
113 образуемых стимулированными в течение 7 суток Т-лимфоцитами, выявила  
114 негативный эффект этапа «отдых» (рисунок 1).

115 Прекультивирование размороженных клеток существенно уменьшало  
116 число дочерних генераций, формируемых как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-  
117 лимфоцитами (P<0,001). Исходя из того, что в пробах «прекультивированные»  
118 по сравнению с пробами «свеже размороженные» снижение количества  
119 дочерних генераций не сопровождается изменением доли CFSE<sup>low</sup> клеток,  
120 можно предположить следующее. В прошедших этап «отдыха» культурах  
121 клеток большее число Т-лимфоцитов вступают в деление, однако они  
122 совершают меньше митозов. Это справедливо, как для CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>  
123 субпопуляций Т-лимфоцитов.

124 Известно, что криоконсервация и последующее размораживание  
125 запускают в клетках процессы, ведущие к гибели. Причинами этого могут  
126 быть физический стресс, вызывающий морфологические изменения,  
127 накопление в митохондриях и цитозоле свободных радикалов, активация  
128 рецепторов смерти и др. [7, 9]. Проведенная нами оценка жизнеспособности  
129 делящихся Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток, показала  
130 следующее (рисунок 2).

131 В пробах «свежезамороженные» относительное количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-  
132 клеток, гибнущих в процессе деления, было сопоставимо. Вместе с тем,  
133 прекультивирование клеток приводило к значительному увеличению доли  
134 умирающих элементов среди вступивших в деление CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов  
135 ( $P < 0,001$ ). При этом в пуле CD8<sup>+</sup> Т-клеток аналогичного последствия этапа  
136 «отдых» не было отмечено. Более того, после прекультивирования процент  
137 гибнущих элементов среди вступивших в деление CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов был  
138 существенно ниже, чем среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток ( $P < 0,01$ ). Ранее рядом авторов  
139 было отмечено, что этап прекультивирования снижает процент гибнущих  
140 клеток среди лимфоцитов, оказывая положительное влияние на  
141 восстановление их функций [8]. Другими исследователями было показано, что  
142 дополнительный «отдых» не улучшал способность Т-лимфоцитов к  
143 продукции интерферона-гамма в ответ на стимуляцию разными антигенами по  
144 сравнению клетками, стимулированными непосредственно после разморозки  
145 [5]. В настоящей работе нами установлено, что прекультивирование  
146 размороженных после криоконсервации клеток приводит к увеличению доли  
147 гибнущих в процессе деления Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7  
148 суток. При данных экспериментальных условиях CD4<sup>+</sup> Т-клетки оказываются  
149 наиболее чувствительными к гибели по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.

150 Таким образом, хотя криоконсервация клеток является рутинным  
151 методом для последующей оценки их функционального состояния, данные,  
152 представленные в доступной литературе, весьма противоречивы. Поскольку  
153 после разморозки Т-лимфоциты демонстрируют относительно высокую  
154 выживаемость и способность к пролиферации, большинство исследований,  
155 как правило, сфокусированы на сравнении и оптимизации различных  
156 методологических подходов [4, 5, 8, 9]. Так, группой авторов был отмечен  
157 позитивный эффект этапа «отдых» на восстановление ряда функций Т-  
158 лимфоцитов [8], тогда как другими исследователями этого не выявлено [5]. В  
159 настоящей работе нами проведена оценка влияния этапа «отдых»  
160 размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации  
161 мононуклеарных клеток периферической крови на пролиферативную  
162 активность Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток. Мы показали,  
163 что среди прошедших прекультивирование клеток доля пролиферирующих  
164 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была сопоставима с таковой в пробах, не  
165 подвергавшихся процедуре «отдых». Вместе с тем, нами был выявлен  
166 негативный эффект прекультивирования клеток на количество дочерних  
167 генераций, формируемых стимулированными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.  
168 Более того, дополнительный «отдых» клеток существенно увеличивал  
169 относительное число Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Важно  
170 отметить, что данный феномен был обнаружен только среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток,  
171 что, по-видимому, отражает их большую чувствительность к гибели *in vitro* по  
172 сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.

#### 173 4 Выводы

174 На основании вышеизложенного можно заключить, что к проведению  
175 культуральных исследований по оценке пролиферативной способности Т-  
176 лимфоцитов, подвергавшихся длительной криоконсервации, необходимо  
177 приступать незамедлительно после разморозки клеток. Это не только  
178 значительно снижает смертность продолжительно культивируемых клеток, но  
179 и позволяет жизнеспособным делящимся лимфоцитам давать большее  
180 количество дочерних генераций.

181 Работа выполнена в рамках государственного задания «Изучение  
182 механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их  
183 оценки в норме и патологии» (номер гос. регистрации 124020500027-7).

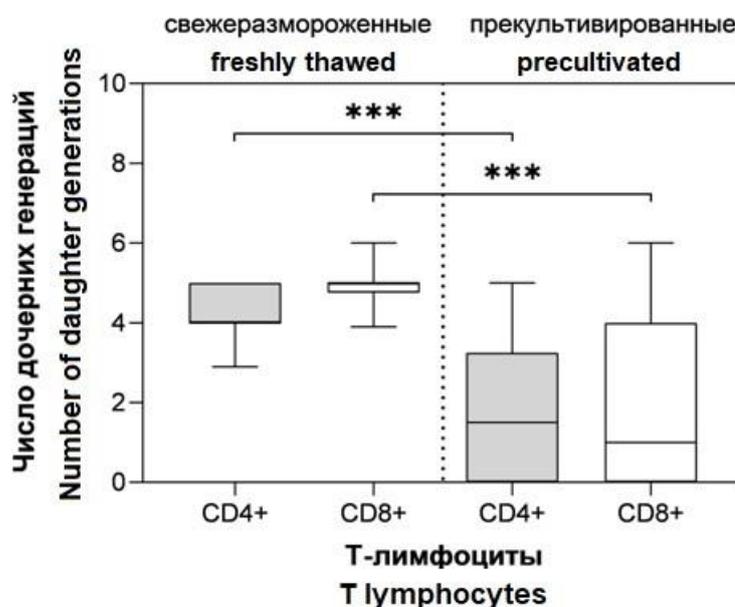
#### 184 **Благодарности**

185 Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследование  
186 материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН. Авторы выражают благодарность  
187 зав. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» д.б.н.  
188 Сайдаковой Е.В. и м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ  
189 УрО РАН» Пономаревой В.Н.

РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на количество дочерних генераций, формируемых стимулированными Т-лимфоцитами.

**Figure 1.** Effect of cryopreserved cells precultivation on the number of daughter generations formed by stimulated T-lymphocytes.

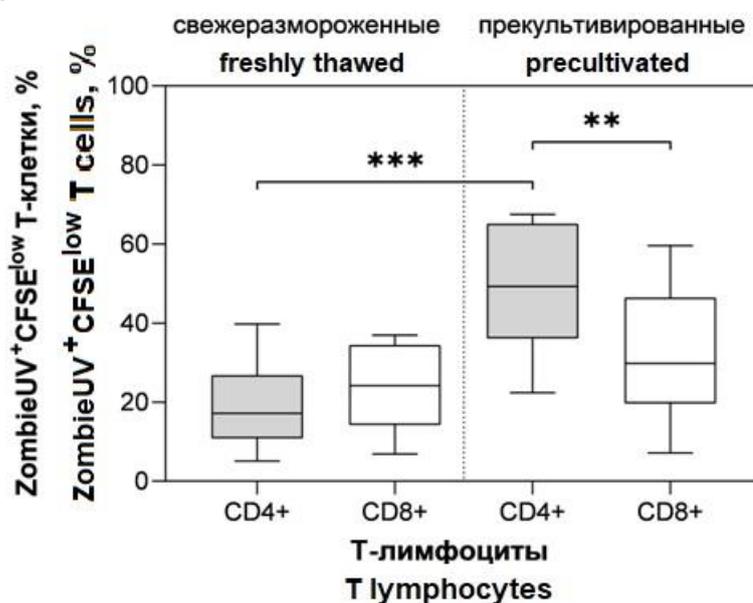


**Примечание.** Свеже размороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90 % интервалы (вертикальные отрезки). \*\*\* –  $P < 0,001$  (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

**Note.** Freshly thawed: Cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultivated: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10–90% intervals (vertical segments) are shown. \*\*\* –  $P < 0.001$  (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

**Рисунок 2.** Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на долю гибнущих элементов среди вступивших в деление Т-лимфоцитов.

**Figure 2.** Effect of cryopreserved cells precultivation on the proportion of dying elements among dividing T lymphocytes.



**Примечание.** Свеже размороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90 % интервалы (вертикальные отрезки). \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$  (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

**Note:** Freshly thawed: Cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultured: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10–90% intervals (vertical segments) are shown. \*\* –  $P < 0.01$ ; \*\*\* –  $P < 0.001$  (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

**ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДААННЫЕ**

**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

**Королевская Лариса Борисовна**, к.м.н., н.с. лаборатории экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

факс: (342) 280-92-11;

телефон: (342) 280-83-34;

e-mail: [bioqueen@mail.ru](mailto:bioqueen@mail.ru)

**Korolevskaya L.B.**, Cand. Sc. (Med.), Research Scientist at the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences (“IEGM UB RAS”);

address: 614081, Perm, 13Goleva str.;

fax: (342) 280-92-11;

telephone: (342) 280-83-34;

e-mail: [bioqueen@mail.ru](mailto:bioqueen@mail.ru)

**Блок 2. Информация об авторах**

**Шмагель Константин Владимирович**, д.м.н., зав. лабораторией экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

**Shmagel K.V.**, Dr. Sc. (Med.), Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences (“IEGM UB RAS”).

**Блок 3. Метаданные статьи**

**ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ, НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ**

**PRECULTIVATION OF CELLS SUBJECTED TO LONG-TERM CRYOPRESERVATION NEGATIVELY AFFECTS THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T-LYMPHOCYTES**

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:  
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ И ДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОК  
CRYOPRESERVATION AND PROLIFERATION OF T CELLS**

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, криоконсервация, пролиферация, прекультивирование (отдых), проточная цитометрия.

**Keywords:** T-lymphocytes, cryopreservation, proliferation, precultivation (rest), flow cytometry.

Иммунологические чтения в Челябинске 2025.

Количество страниц текста – 7,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

18.03.2025

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes // Immunol. Invest., 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 109-142.	-	DOI: 10.1081/imm-120030732
2	Browne D.J., Miller C.M., Doolan D.L. Technical pitfalls when collecting, cryopreserving, thawing, and stimulating human T-cells // Front. Immunol., 2024, Vol. 15:1382192.	-	DOI: 10.3389/fimmu.2024.1382192
3	Capelle C.M., Ciré S., Ammerlaan W., Konstantinou M., Balling R., Betsou F., Cosma A., Ollert M., Hefeng F.Q. Standard Peripheral Blood Mononuclear Cell Cryopreservation Selectively Decreases Detection of Nine Clinically Relevant T Cell Markers // Immunohorizons, 2021, Vol. 5, pp. 711-720.	-	DOI: 10.4049/immunohorizons.2100049
4	Li B., Yang C., Jia G., Liu Y., Wang N., Yang F., Su R., Shang Y., Han Y. Comprehensive evaluation of the effects of long-term	-	DOI: 10.1186/s12865-022-00505-4

	cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry // BMC Immunology, 2022, Vol. 23:30.		
5	Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschhorn D.F., Epling C.L., Tan Q.X., Custer B., Harris J.M., Jacobson M.A., McCune J.M., Martin J.N., Hecht F.M., Deeks S.G., Norris P.J. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation // J. Immunol. Methods, 2007, Vol. 326, pp. 93-115.	-	DOI: 10.1016/j.jim.2007.07.012
6	Santos R., Buying A., Sabri N., Yu J., Gringeri A., Bender J., Janetzki S., Pinilla C., Judkowski V.A. Improvement of IFN $\gamma$ ELISPOT Performance Following Overnight Resting of Frozen PBMC Samples Confirmed Through Rigorous Statistical Analysis // Cells, 2014, Vol. 24, pp. 1-18.	-	DOI: 10.3390/cells4010001
7	Sarkar S., Kalia V., Montelaro R.C. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing // Cryobiology, 2003, Vol. 47, no. 1, pp. 44-58.	-	DOI: 10.1016/s0011-2240(03)00068-3
8	Wang L., Hückelhoven A., Hong J., Jin N., Mani J., Chen B.A., Schmitt M., Schmitt A. Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting	-	DOI: 10.1002/cyto.a.22813

	process for clinical immunomonitoring – Development of an algorithm // Cytometry A, 2016, Vol. 89, pp. 246-258.		
9	Zhang J., Yin Z., Liang Z., Bai Y., Zhang T., Yang J., Li X., Xue L. Impacts of cryopreservation on phenotype and functionality of mononuclear cells in peripheral blood and ascites // J. Transl. Intern. Med., 2024, Vol. 12, no. 1, pp. 51-63.	-	DOI: 10.2478/jtim-2023-0136